

REC'D 06 AUG 2003

WIPO

PCT

Rec'd PCT 18 JAN 2005

PCT/KR 03/01442

RO/KR 21.07.2003

대한민국특허청
KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2002-0042792

Application Number

출원년월일 : 2002년 07월 20일

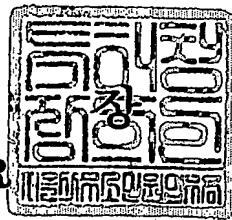
Date of Application

출원인 : 한국과학기술연구원
Applicant(s) KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

2003 년 07 월 14 일

특허청

COMMISSIONER



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0011
【제출일자】	2002.07.20
【국제특허분류】	A61K 9/00
【발명의 명칭】	방광내 투여를 통한 방광암치료용 파클리 탁셀 조성을 및 그의 제조 방법
【발명의 영문명칭】	Paclitaxel composition for the intravesical treatment of bladder tumor and preparation method thereof
【출원인】	
【명칭】	한국과학기술연구원
【출원인코드】	3-1998-007751-8
【대리인】	
【성명】	박장원
【대리인코드】	9-1998-000202-3
【포괄위임등록번호】	2000-005976-8
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정혜선
【성명의 영문표기】	CHUNG, Hesson
【주민등록번호】	611117-2030217
【우편번호】	402-715
【주소】	인천광역시 남구 관교동 쌍용아파트 3동 507호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정서영
【성명의 영문표기】	JEONG, Seo Young
【주민등록번호】	560310-1019120
【우편번호】	411-747
【주소】	경기도 고양시 일산구 주엽2동 문촌마을 라이프아파트 205 동 501호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 권익찬
 【성명의 영문표기】 KWON, Ick Chan
 【주민등록번호】 590302-1690820
 【우편번호】 139-230
 【주소】 서울특별시 노원구 하계동 시영7단지아파트 706동 704호
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 박영택
 【성명의 영문표기】 PARK, Yeong Taek
 【주민등록번호】 580601-1821012
 【우편번호】 425-735
 【주소】 경기도 안산시 본오3동 태영아파트 203동 602호
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이인현
 【성명의 영문표기】 LEE, In Hyun
 【주민등록번호】 751202-1560314
 【우편번호】 156-011
 【주소】 서울특별시 동작구 신대방1동 600-99
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김세웅
 【성명의 영문표기】 KIM, Se Woong
 【주민등록번호】 610524-1093919
 【우편번호】 463-020
 【주소】 경기도 성남시 분당구 수내동 파크타운 116동 2001호
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이승주
 【성명의 영문표기】 LEE, Seung Ju
 【주민등록번호】 680708-1093919
 【우편번호】 158-765

1020020042792

출력 일자: 2003/7/15

【주소】	서울특별시 양천구 신정2동 1279 목동현대아파트 106동 810호		
【국적】	KR		
【심사청구】	청구		
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정 에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 박장원 (인)		
【수수료】			
【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	24	면	24,000 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	43	항	1,485,000 원
【합계】	1,538,000 원		
【감면사유】	정부출연연구기관		
【감면후 수수료】	769,000 원		
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통		

【요약서】**【요약】**

본 발명은 방광암치료를 위한 파클리탁셀의 조성을 및 그것의 제조 방법에 관한 것으로, 상기 파클리탁셀의 조성을 한 가지 이상의 모노글리세라이드 (monoglyceride) 계화합물 4~90 중량%, 한 가지 이상의 기름 (oil) 0.01~90 중량%, 한 가지 이상의 유화제 0.01~90 중량% 및 파클리탁셀 (paclitaxel) 0.01 ~ 20 중량%로 이루어진다. 본 발명의 조성을은 파클리탁셀을 잘 용해시키고, 시간이 경과하여도 침전을 형성시키지 아니하며, 방광내 벽에 잘 흡착되며 방광 내 근육총 까지 침투하여 방광암을 효과적으로 치료한다.

【대표도】

도 1

【명세서】**【발명의 명칭】**

방광내 투여를 통한 방광암치료용 파클리탁셀 조성물 및 그의 제조 방법 {Paclitaxel composition for the intravesical treatment of bladder tumor and preparation method thereof}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 실시예 1의 방광암치료용 파클리탁셀 조성물을 방광내 투여한 후 소변과 방광조직내의 파클리탁셀의 농도를 HPLC 법으로 정량한 그래프이다. 실시예 1의 방광암치료용 파클리탁셀 조성물 1 ml (파클리탁셀 6 mg)를 방광내 투여 하였다 (실험군). 비교군으로 실시예 1의 방광암치료용 파클리탁셀 조성물 1 ml를 19 ml의 물에 분산시킨 후 방광내 투여한 군 (분산대조군, 파클리탁셀 6 mg)과 Bristol-Myers Squibb 사의 Taxol[®] 1 ml를 19 ml의 물에 분산시킨 후 방광내 투여한 군 (Taxol[®], 파클리탁셀 6 mg)을 사용하였다.

도 2는 본 발명의 실시예 1의 방광암치료용 파클리탁셀 조성물을 방광내 투여한 후 방광조직의 깊이에 따른 파클리탁셀의 농도변화를 HPLC 법으로 정량한 그래프이다.

- ● - ; 본 발명의 방광암치료용 파클리탁셀 조성물 1 ml (파클리탁셀 6 mg),
- ○ - ; 본 발명의 실시예 1의 방광암치료용 파클리탁셀 조성물 1 ml를 19 ml의 물에 분산시킨 후 방광내 투여한 군 (분산 대조군, 파클리탁셀 6 mg)과 ,
- ▲ - ; Bristol-Myers Squibb 사의 Taxol?? 1 ml를 19 ml의 물에 분산시킨 후 방광내 투여한 군 (Taxol??, 파클리탁셀 6 mg)

도 3은 본 발명의 실시예 2의 방광암치료용 파클리탁셀 조성물을 방광암세포를 이식한 생쥐의 방광에 투여하고 2 주 경과후 방광조직의 pathology 사진이다.

가: 인산완충용액 투여군

나: 본 발명의 상기 실시예 1의 파클리탁셀 조성물 0.2 ml (파클리탁셀 1.2 mg/mouse) 투여군

도 4는 본 발명의 실시예 2의 방광암치료용 파클리탁셀 조성물을 방광암세포를 이식한 생쥐의 방광에 투여하고 2 주 경과 후 방광조직의 무게를 나타낸 그래프이다.

대조군: 인산완충액 투여군

실험군: 본 발명의 상기 실시예 1의 파클리탁셀 조성물 0.2 ml (파클리탁셀 1.2 mg/mouse) 투여군

도 5는 본 발명의 실시예 1의 방광암치료용 파클리탁셀 조성물을 인산완충용액을 넣고 파클리탁셀의 농도가 0.1, 1, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 희석하여 첨가했을 때의 방광암세포주의 세포생존율을 나타낸 그래프이다.

■: 실시예 1의 파클리탁셀 조성물 첨가군

□: 파클리탁셀을 함유하지 않은 것을 제외하고는 실시예 1의 방광암치료용 파클리탁셀 조성물과 동일한 비교조성물 첨가군

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <15> 본 발명은 방광암치료를 위한 파클리탁셀의 조성을 및 그것의 제조 방법에 관한 것이다.
- <16> 방광암은 전세계적으로 11번째 발생빈도를 가진 암으로써, 모든 악성종양 환자의 3 - 4 %를 차지한다. 전세계적으로 매년 약 20 만명 이상의 새로운 환자가 발생하며, 이 중에서 15 만명 이상이 남성이다. 방광암은 대체적으로 표재성 방광암, 침윤성 방광암 및 전이성 방광암으로 구분된다.
- <17> 표재성 방광암이란 방광암이 방광점막이나 그 바로 아래층인 고유층(lamina propria)에 국한된 경우를 말하며, 침윤성 방광암이란 방광암이 방광의 근육층까지 침범하였으나 방광 밖으로는 퍼지지 않은 경우를 말한다. 또한, 전이성 방광암이란 방광암이 방광벽을 넘어서 주위 장기를 침범하였거나 임파선 혹은 원격장기에 전이된 경우를 말한다.
- <18> 표재성 방광암을 치료하기 위해서 일반적으로 경요도적 방광암 절제술을 시행한다. 즉, 외요도구를 통하여 방광 내로 절제경을 삽입하여 암을 절제하는 방법이다. 이 경우, 재발율이 30 - 85 %나 되기 때문에, 재발억제를 위하여 수술 후 예방적으로 방광 내에 약물을 주입한다. 이 때 사용되는약제로서, 결핵 예방접종에 이용되는 약제인 비씨지 (BCG)가 가장 많이 이용되고 있으며, 그 외에도, 아드리아마이신(adriamycin) 또는 마이토마이신-씨(mitomycin C)와 같은 항암제들도 이용되고, 대개 1주일 한 번씩 6~8주간

투여하게 된다. 이와 같은 보존적 요법이 실패하거나 암의 숫자가 많고 범위가 넓은 경우에는 침윤성 암에서 시행되는 방광 전적출술을 시행할 수도 있다.

<19> 침윤성 방광암의 치료방법은 근치적 방광 전적출술 후, 요로전환을 시행하는 방법이 주로 사용된다. 근치적 방광 전적출술이란 남자의 경우에는 방광과 함께 전립선, 정낭, 방광주위 지방 및 방광 위쪽을 둘러싸는 복막을 모두 함께 적출하는 방법을 말하며, 여자의 경우에는 방광, 요도, 난소, 자궁, 자궁경부, 질의 일부분 그리고 방광 및 자궁을 둘러싸는 복막을 모두 함께 적출하는 방법이다. 방광암이 단일병소이면서 방광의 측벽이나 전정부에 국한되어 있는 경우에는 방광 부분절제술을 시행할 수도 있다. 이 경우 방광의 다른 부위에 상피세포내암 등이 없어야 하므로 이 수술이 가능한 경우는 극히 제한적이며 근치적 방광 전적출술에 비해 국소재발률이 높다. 일부 선택된 환자에서는 방광보존 치료법을 경요도적 방광암 절제술, 항암화학요법, 방사선치료가 시행되기도 한다.

<20> 전이성 방광암의 치료를 위해서는 방사선요법 혹은 항암요법이 시행된다. 단일약제로서 가장 효과가 좋은 항암제는 시스플라틴(cisplatin)이며, 따라서 시스플라틴을 포함하는 항암제의 병용요법이 시행된다.

<21> 진행된 방광암의 경우 수술을 하면 방광의 원래기능은 상실하게 되므로 최근에는 방사선치료와 항암제치료를 병행하여 치료를 먼저하고 병이 남아있거나 재발한 경우에만 수술을 하여 가능한한 방광을 최대한 보존하려고 하는 연구나 치료가 많이 진행되고 있다. 그러나, 수술을 피하기 위해서는 가능한한 종양의 크기가 작

아야하고, 수신증(hydronephrosis)이 없어야한다. 방광암에 사용되는 항암제로는 아드리아마이신(adriamycin), 마이토마이신-씨(mitomycin C), 시스플라틴 등이 있다. 최근 들어서는 겜스타비신(gemstabicine), 파클리탁셀(paclitaxel) 또는 도세탁셀(docetaxel)이 방광암 치료에 이용되기 시작하고 있다. 이와 같은 화학치료는 단독으로 사용되기도 하고, 표재성 방광암의 치료 시에 경요도적 방광암 절제술과 병행하여 시행되기도 한다. 방광내 화학치료의 경우, 항암제를 도관을 통해 방광에 주입하며, 수 시간 동안 방광내에서 약효가 지속되어 방광의 세포에 영향을 미친다. 대개 일주일에 한 번씩 수 주 동안 시행된다. 30년 이상의 임상시험 끝에 방광내 투여에 적합한 항암제로는 티오페파(thiotepa) 와 그와 관련된 알킬화 약품인 에토글루시드(ethoglucid), 아드리아마이신(독소루비신)과 그 유도체인 에피루비신, 빌루비신과 마이토마이신 C 등 3 종류가 선별되었다. 경요도적 방광암 절제술만 실시할 경우에 비하여 시술후 방광내 항암제투여시 재발율이 60 %에서 45 %로 감소한다.

<22> 그러나, 이와 같은 항암제 투여는 부작용을 야기시키기도 한다. 티오페아의 경우의 전신적 흡수로 인한 myelosuppression 이 일어나기도 하며, 아드리아마이신에 의한 과민증(hypersensitivity), 마이토마이신으로 인한 피부 또는 성기의 발진 등이 그 예이다.

<23> 최근 들어서는 파클리탁셀과 도세탁셀을 방광암 치료에 사용하려는 실험이 진행되고 있다. 항암제 파클리탁셀은 난소암, 유방암, 식도암, 흑색종, 백혈병, 폐암, 위암 뿐 아니라 전립선암, 결장암, 방광암, 임파선종양, 간종양, 중추신경종

양, 뇌종양 등 각종 암에 대해 현저한 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 현재 임상요법에 사용되어지고 있는 파클리탁셀 제제는 미국 Bristol-Myers Squibb 사의 Taxol??로서 다른 항암제에 비해서도 물에 대한 용해도가 낮기 때문에 에멀젼 예비 농축액(emulsion preconcentrate, self-emulsifying system) 형태로 사용되고 있다. Taxol??은 파클리탁셀이 폴리옥시 35 캐스터 오일 (polyoxy1 35 castor oil)이라는 크레모포어 EL (Cremophor EL), 폴리옥실에틸화 캐스터 오일 (polyoxylethylated castor oil), 폴리옥시에톡실화 캐스터 오일 (polyoxyethoxylated castor oil)의 혼합물과 무수 알코올 (dehydrated alcohol)과 섞인 용액 형태의 주사제이다(미국특허 제 5438072호 참조). 그러나, 이 제제는 크레모포어의 독성 때문에 용법 및 용량에 많은 제한이 따른다. 이에 따라, 독성이 적고 물리적 안정성이 높은 제제를 개발하기 위하여 지질 에멀젼(lipid emulsion), 중합 미셀(polymeric micelle), 리포좀 (liposome) 등을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있고 이들에 대한 다수의 특허가 등록되어 있다. 에멀젼 제제의 경우, 일반적으로 많이 사용되는 오일 및 유화제를 사용한 에멀젼을 비롯하여 고형 지질 나노입자 (solid lipid nanoparticle), 에멀젼 예비 농축액 등 다양한 특허가 등록되어 있다. 리포좀, 중합 나노입자(polymeric nanoparticle), 중합 미셀(polymeric micelle)을 이용한 가용화 기술도 최근 수년간 다양하게 개발되었다. 이러한 파클리탁셀 제제의 개발은 그동안 다른 난용성 약물을 개발하며 축적된 기술을 바탕으로 급속도로 진행되고 있다. 또한, 파클리탁셀은 현재 전이성 난소암과 유방암 등으로 사용이 제한되어 있으나, 3상 임상실험이 끝나면 다양한 종류의 암에 처방될 것이 유력하므로 시장성이 큰 항암제이다.

<24> 제제적인 측면에서 볼 때 시판되고 있는 Taxol

⑤은 파클리탁셀이 매우 난용성이기 때문에 주사전 주사제 원액을 희석할 때 침전물이 생성되는 것이 문제로 지적되고 있다. 이러한 침전생성 문제를 고려하여 주사제로 개발된 것이 in-line filter를 장착시킨 주입용 주사제인데, 이 제제는 24시간 이상 약물을 투여해야 한다는 불편이 단점으로 지적되고 있다. 또한, 주입을 위하여 주사제 원액을 생리 식염수 등에 희석할 때 사용되어지는 PVC 인퓨전 백(infusion bag)은 가소제를 용출시킴으로써 인체에 대한 안전성에 대한 문제점을 놓고 있다. 또한, 약리학적 측면에서 는 부형제로 사용되어진 크레모포어 EL은 환자에 대한 과민반응, 혈관이완, 호흡곤란, 무기력, 고혈압 등의 큰 부작용을 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서, 제제적인 측면과 약리학적 측면에서 지적된 약물의 안정성과 인체에 대한 안전성을 확보하기 위해서 다른 투약경로에 대한 연구와 그에 따른 제제연구가 필요한 실정이다.

<25> 파클리 탁셀은 in vitro에서 방광암 세포에 독성을 보이지만, Taxol®을 방광내 투여하면 방광세포에 의해 거의 흡수되지 않으므로 방광암의 치료 또는 재발방지에 거의 효과가 없다. 따라서, 파클리탁셀을 이용하여 방광암을 치료하려면, 파클리탁셀을 가용화하여 방광에 흡수될 수 있도록 새로운 제형을 개발하는 것이 필수적이다.

<26> 한편, 모노올레인은 모노글리세라이드의 일종으로 글리세릴 모노올레이트로 불리기도 한다. 모노올레인은 점막세포에서 생체내의 물과 섞이면 흡착력이 큰 큐빅상으로 존재한다. 이와 같은 성질을 이용하여 생체흡착력이 강한 파클리탁셀 조성물을 만들 수 있다. 그러나, 큐빅상은 너무 점성이 강하기 때문에 요도를 막을 위험이 있다. 따라서, 점막흡착성은 그대로 유지하면서, 체내에서 소변과 섞일 경우 분산계를 형성하므로 요도를 막을 위험이 없는 새로운 조성물을 개발할 필요가 있다. 또한, 분산계를 형성한 후에도

파클리탁셀이 석출되지 않고 분산된 입자내에 잘 봉입되어 있어야 약효를 나타낼 수 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<27> 따라서, 본 발명의 목적은 침전을 형성하지 아니하고 방광내 흡수율이 효과적으로 증대되고 방광 내에 직접 투여되는 파클리탁셀의 가용화 조성을 및 그 제조 방법을 제공하는 것이다.

<28> 더욱 구체적으로, 본 발명의 목적은 방광내투여가 가능한 파클리탁셀의 조성을 제공하는 데 있다.

<29> 또한, 본 발명의 목적은 상기 가용화용 조성물의 액상 제형 및 반고형 제형, 및 그의 제조 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<30> 본 발명은 한 가지 이상의 모노글리세라이드계 화합물, 한 가지 이상의 기름 및 한 가지 이상의 유화제를 파클리탁셀과 혼합하여 제조되는 방광내 직접 투여를 위한 유성 파클리탁셀의 가용화용 조성을 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

<31> 우선, 본 발명은 방광암 치료를 위한 파클리탁셀의 가용화용 조성을 제공한다.

<32> 구체적으로, 상기 조성물은, 조성물의 총 중량을 기준으로, 한 가지 이상의 모노글리세라이드 (monoglyceride)계 화합물 4~90 중량%, 한 가지 이상의 기름 (oil) 0.01~90 중량%, 한 가지 이상의 유화제 0.01~90 중량% 및 파클리탁셀 (paclitaxel) 0.01~20 중량%를 포함한다.

- <33> 상기 모노글리세라이드계 화합물로서 포화 또는 불포화된 C₁₀-C₂₂인 모노글리세라이드계 화합물 중에서 1 가지 이상을 선택하여 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명의 모노글리세라이드계 화합물로서 모노올레인(Monoolein), 모노팔미톨레인(Monopalmitolein), 모노미리스톨레인(Monomyristolein), 모노일레이딘(Monoelaidin), 모노이루이신(Monoerucin) 및 식물성 또는 동물성 기름의 트리글리세라이드로부터 반합성된 모노글리세라이드의 혼합물을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 모노올레인을 사용할 수 있다.
- <34> 상기 기름으로서 파클리탁셀을 용해시킬 수 있는 트리글리세라이드, 요오드화 기름, 식물성 기름 또는 동물성 기름을 사용하는 것이 바람직하다.
- <35> 상기 트리글리세라이드로는 포화 또는 불포화된 C₂-C₂₀인 모노글리세라이드계 화합물 중에서 한 가지 이상 선택하여 사용하는 것이 바람직하다. 트리아세틴(triacetin), 트리부티린(tributyrin), 트리카프로인(tricaproin), 트리카프릴린(tricaprylin), 트리카프린(tricaprin), 또는 트리올레인(triolein) 등이 사용될 수 있다.
- <36> 상기 요오드화 오일로는 리피오돌, 요오드화 양귀비씨 기름(iodized poppy seed oil), 에티오돌(ethiodol) 또는 요오드화 대두유(iodized soybean oil) 등이 사용될 수 있다.
- <37> 상기 식물성 기름으로는 콩기름, 면실유, 올리브유, 양귀비씨 기름, 흥화씨기름 또는 참기름 등이 사용될 수 있다.
- <38> 상기 동물성 기름으로는 스쿠알란 또는 스쿠알렌 등이 사용될 수 있다.

- <39> 상기 유화제로는 인지질, 비이온성 계면 활성제, 음이온성 계면 활성제, 양이온성 계면 활성제 또는 담즙산 (bile acid)을 사용하는 것이 바람직하다.
- <40> 상기 인지질로는 포스파티딜콜린 (Phosphatidyl Choline) 유도체, 포스파티딜에탄올아민 (Phosphatidyl ethanolamine) 유도체, 포스파티딜세린 (Phosphatidyl serine) 유도체 또는 친수성 고분자가 결합된 지질 (polymeric lipid) 등이 사용될 수 있다.
- <41> 상기 비이온성 계면 활성제로는 폴록사머 (Poloxamer; Pluronic; 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체), 솔비탄 에스테르 (Sorbitan esters; Span), 폴리옥시에틸렌솔비탄 (polyoxyethylene sorbitans; Tween), 또는 폴리옥시에틸렌 에테르 (polyoxyethylene ethers; Brij) 등이 사용될 수 있다.
- <42> 상기 음이온성 계면 활성제로는 포스파티딜세린 유도체, 포스파티딘산 (Phosphatidic acid) 유도체, 또는 소듐 도데실 셀페이트 (sodium dodecyl sulfate; 이하 'SDS'라 약칭함) 등이 사용될 수 있다.
- <43> 상기 양이온성 계면 활성제로는 1,2-다이올레일-3-트리메틸암모니움 프로판 (1,2-dioleyl-3-trimethylammonium propane; 이하 'DOTAP'이라 약칭함), 다이메틸 다이옥타데실암모니움 클로라이드 (dimethyldioctadecylammonium chloride; 이하 'DDAB'라 약칭함), N-[1-(1,2-다이올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모니움 클로라이드 (N-[1-(1,2-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride; 이하 'DOTMA'라 약칭함), 1,2-다이올레일-3-에틸포스포콜린 (1,2-dioleyl-3-ethylphosphocholine; 이하 'DOEPC'라 약칭함), 또는 3 β -[N-[N',N'-다이메틸아미노)에탄]카바모일]콜레스테롤 (3 β -[N-[N',N'-dimethylamino)ethan]carbamoyl]chloresterol; 이하 'DC-Chol'이라 약칭함) 등이 사용될 수 있다.

- <44> 상기 담즙산으로는 콜린산 (cholic acid), 그의 염 또는 그의 유도체, 데옥시콜린산 (Deoxycholic acid), 그의 염 또는 그의 유도체, 리토콜린산 (Lithocholic acid), 그의 염 또는 그의 유도체, 또는 체노콜린산 (Chenocholic acid), 그의 염 또는 그의 유도체 등이 사용될 수 있다.
- <45> 또한 상기 조성물에는 기타 첨가제를 조성물의 총 중량에 대하여 5 중량% 이내로 추가적으로 첨가할 수 있다. 예를 들어, 파클리탁셀의 가용성을 증진시키기 위하여 알코올, 폴리올 또는 크레모포어를 추가적으로 포함할 수 있으며, 산화 방지를 위해 토코페롤, 토코페롤 아세테이트 등을 첨가할 수 있으며, 파클리탁셀의 흡수성을 증진시키기 위하여 지방산, 지방산의 에스테르 유도체 또는 지방산의 알코올 유도체를 추가적으로 함유할 수 있다. 또한, 증상에 따라 저절한 난용성 약물을 추가적으로 함유할 수 있다.
- <46> 상기 난용성 약물로는 항암제 또는 P-Glycoprotein 억제제 등이 사용될 수 있다.
- <47> 상기 항암제로는 독소루비신, 시스플라틴, 카보플라틴, 카무스틴 (BCNU), 다카바진, 에도포사이드, 플루오로우라실 (5-FU), 겜스타비신, 또는 파클리탁셀 유도체 등이 사용 될 수 있다. 이 때, 상기 파클리탁셀 유도체로는 도시탁셀, 브로모탁셀, 탁소티어 등이 사용 될 수 있다.
- <48> 상기 P-당단백질 억제제로는 신코닌(cinchonin), 칼슘 채널 저해제, 칼모듈린 길항제, 빈카 알칼로이드(Vinca alcaloid), 항고혈압제, 스테로이드, 항부정맥제, 구충제, 또는 면역억제제 등이 사용 될 수 있다. 이 때, 상기 칼슘 채널 저해제로는 베라파밀(verapamil), 니페디핀(nifedipine), 니카디핀(nicardipine) 또는 니트렌디핀(nitrendipine)과 같은 디히드로피리딘(dihydropyridines) 등이 사용 될 수 있다. 또한, 상기 칼모듈린 길항제로는 트리플루오로페라진(trifluoroperazine) 등이 사용 될 수 있

다. 또한, 상기 항고혈압제로는 레세핀(reserpine) 등이 사용 될 수 있다. 또한, 상기 빈카 알칼로이드로는 빈크리스틴(vincristine), 또는 빈블라스틴(vinblastine) 등이 사용 될 수 있다. 또한, 상기 스테로이드로는 프로게스테론 등이 사용 될 수 있다. 또한, 상기 항부정맥제로는 아미오다론(amiodarone) 또는 쿠니딘(quinidine) 등이 사용 될 수 있다. 또한, 상기 구충제로는 쿠나크린(quinacrine), 또는 쿠닌(quinine) 등이 사용 될 수 있다. 상기 면역억제제로는 사이클로스포린류, 스타우로스포린(staurosporine), 또는 태크로리미스(tacrolimus) 등이 사용 될 수 있다.

- <49> 상기 조성물은 한 가지 이상의 모노글리세라이드, 한 가지 이상의 기름, 한 가지 이상의 유화제 및 파클리탁셀을 상온에서 또는 가온하여 섞어서 제조할 수 있다.
- <50> 보다 구체적으로, 상기 방광암치료를 위한 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조방법은,
- <51> 1) 조성물의 총 중량을 기준으로, 4 내지 90 중량%의 한 가지 이상의 모노글리세라이드계 화합물, 0.01 내지 90 중량%의 한 가지 이상의 기름을 0.01 내지 90 중량%의 한 가지 이상의 유화제와 함께 50 °C 이하로 가온하여 완전히 용해시켜 점성의 액체를 만드는 단계 (단계 1); 및
- <52> 2) 상기 단계 1의 액체를 0.01 내지 20 중량%의 파클리탁셀과 혼합하여 균일한 상을 제조하는 단계 (단계 2)를 포함하여 이루어진다.
- <53> 상기 조성물의 제조 방법을 한 예로서 설명하면, 모노글리세라이드계 화합물을 기름 및 유화제와 함께 50 °C 이하로 가온하여 완전히 녹여서 얻어진 점성의 액체에 치료

적 유효 성분으로서 파클리탁셀을 첨가한 후, 상온 또는 50 °C 이하로 가온하여 저어주거나 3 ~ 5 분간 소니케이션하여 균일한 상의 조성물을 제조할 수 있다.

- <54> 상기 방광암치료를 위한 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 또 다른 제조방법은,
- <55> 1) 조성물의 총 중량을 기준으로, 한 가지 이상의 기름을 0.01 내지 20 중량%의 파클리탁셀과 혼합한 후 배쓰형 소니케이터에서 소니케이션하여 완전히 용해시켜 파클리탁셀 용액을 만드는 단계 (단계 1); 및
- <56> 2) 상기 단계 1의 파클리탁셀 용액을 0.01 내지 90 중량%의 한 가지 이상의 유화제 및 4 내지 90 중량%의 한 가지 이상의 모노글리세라이드계 화합물과 혼합하여 균일한 상을 제조하는 단계 (단계 2)를 포함하여 이루어진다.
- <57> 상기 명시한 제조방법들은 방광암치료를 위한 파클리탁셀의 가용화용 조성물을 제조하기 위한 일례에 불과하며, 이외에도 여러 가지 제조방법을 사용할 수 있다.
- <58> 본 발명에 따른 방광암 치료를 위한 파클리탁셀의 조성물은 방광 내로 투여되어 방광암 치료에 사용된다.
- <59> 특히, 본 발명에 의한 방광암치료를 위한 파클리탁셀의 조성물은 방광내로 직접 투여하는 것이 바람직하다. 본 발명에 의한 방광암치료를 위한 파클리탁셀의 조성물은 표재성 또는 침윤성 방광암 치료를 위하여 경요도적 방광암 절제술을 시행한 후 방광내로 직접 투여하는 것이 더욱 바람직하다.
- <60> 상기 방광암치료를 위한 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 방광내로 투여하는 방법은
- <61> 1) 소변의 양을 10 ml 또는 그 이하로 줄이는 단계 (단계 1); 및

- <62> 2) 본 발명의 방광암치료를 위한 파클리탁셀의 조성물 10 ~ 100 ml를 방광내로 요도 카테터를 이용하여 주입하여 최소 2 시간 이상 방광내에 머물게 하는 단계 (단계 2)를 포함하여 이루어진다.
- <63> 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 방광내로 투여하는 방법에는 소변의 생성속도를 1 ml/min 또는 그 이하로 조절하는 방법을 추가할 수 있다.
- <64> 상기 방광암 치료를 위한 파클리탁셀의 가용화용 조성물을 방광내로 투여하는 방법은 1회 이상 실시할 수 있다. 또한, 상기 방광암치료를 위한 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 방광내로 투여하는 방법은 6 주 이상 실시할 수 있다.
- <65> 본 발명에 의한 방광암치료를 위한 파클리탁셀의 조성물은 Ta, T1 또는 Tis 종양의 치료를 위하여 경요도적 방광암 절제술을 시행한 후 방광내로 직접 투여한다.
- <66> 본 발명의 방광암 치료를 위한 파클리탁셀의 가용화용 조성물은 상온에서 보관하면 그 조성에 따라 액상 또는 겔 형태 (gel type)의 반고상 (semi-solid form)으로 존재하며, 유효성분인 파클리탁셀을 비롯하여 각 성분이 변질되지 않고 조성의 물리적 성질이 장기간 유지되는 매우 안정한 제형이다. 또한 본 발명의 파클리탁셀의 가용화용 조성물을 과량의 물 또는 수용액에 분산시키면, 400 nm 이상의 입자로 분산되며, 시간이 경과하여도 분산액에서 침전이 형성되지 않고 방광벽에 잘 흡착되므로 파클리탁셀을 효율적으로 가용화시키는 조성물이다.
- <67> 이하 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- <68> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

<69> <실시예 1>

<70> 조성비의 변화에 따른 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조 1

<71> (1) 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조

<72> 모노올레인 1 g, 트리카프릴린 0.5 g과 tween 80 0.3 g을 넣은 후 약 40 °C로 가열하여 완전히 섞어서 점성의 유성용액 (oily solution)을 제조하였다. 유성용액에 10.8 mg의 파클리탁셀을 첨가한 후 배쓰형 소니케이터에서 초음파처리 하여 완전히 용해시켰다.

<73> (2) 가용화용 조성물의 특성 분석

<74> 종류수 3 mL에 상기 액상 제형 2 μL를 가한 후 잘 흔들어 혼합하여 분산액을 제조한 후 입자 크기 및 분산도 (polydispersity)를 측정하였다. 본 발명에서 입자의 크기 측정은 말버른 제타사이저 (Malvern Zetasizer)를 이용한 광자 분광법 (Photon Correlation spectroscopy; QELS법)으로 측정하였으며 동일한 시료를 3 회 측정하여 평균값을 구하였고, 분산도 (polydispersity)는 입자 크기의 일반적인 분포도로 알려진 정상 로그 분포도의 로그-스케일에서의 분산 정도로 나타내었다 (Orr, *Encyclopedia of emulsion technology*, 1, 369-404, 1985). 하기의 모든 실시예에서도 입자 크기 및 분산도 측정에 상기 방법을 사용하였다.

<75> 상기 조성물은 물에 잘 분산되었고 평균 입자 크기는 600 nm 내외였다. 분산 후 24 시간이 경과하여도 파클리탁셀의 침전이 편광현미경상에서 관찰되지 않았으며 분산계는 상분리 없이 안정하였다. 상기 조성물은 상온에서는 반고형, 냉장 보관시 고형으로 존재하나 40 °C 이상에서는 액상으로 존재한다.

<76> <실시예 2>

<77> 조성비의 변화에 따른 유화제를 첨가한 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조 2

<78> 모노올레인 1 g, 트리카프릴린 1 g과 tween 80 0.4 의 유성용액에 14.4 mg의 파클리탁셀을 첨가한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 조성물 및 분산액을 제조하고 입자 크기를 측정한 결과 조성물은 물에 잘 분산되었으며 입자 크기는 560 nm였다. 분산 후 24시간이 경과하여도 pacltaxel의 침전이 편광현미경상에서 관찰되지 않았으며 분산계는 상분리 없이 안정하였다. 상기 조성물은 상온에서는 반고상, 냉장 보관시 고상으로 존재하나 40 °C 이상에서는 액상으로 존재한다.

<79> 상기 실시예 1와 실시예 2의 결과를 종합하여 각조성물의 함량 및 물에 분산하였을 때의 입자크기 및 분산도를 하기 표 1에 나타내었다.

<80> 【표 1】

함량 (무게 %)				입자크기 (nm)	실시예
모노올레인	트리카프릴린	트윈 80	파클리탁셀		
55.2	27.6	16.6	0.6	600 (0.200)	1
41.4	41.4	16.6	0.6	560 (1.000)	2

<81> <비교예 1>

<82> 오일이 첨가되지 않은 유화제를 첨가한 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조 1

<83> 모노올레인 1 g과 tween 80 0.2 g의 유성용액에 7.2 mg의 파클리탁셀을 첨가한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 조성물 및 분산액을 제조하고 입자 크기를 측정한 결과 조성물은 물에 잘 분산되었으며 입자 크기는 670 nm였다. 그러나 분산후 약 1 시간이 경과한 후 편광현미경상에서 파클린탁셀의 침전이 관찰되었으며, 분산액이 불안정해짐을 관찰하였다.

<84> <비교예 2>

<85> 오일이 첨가되지 않은 유화제를 첨가한 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조 2

<86> 모노올레인 1 g, 플루로닉 F-68(pluronic F-68) 0.24 g의 유성용액에 7.4 mg의 파클리탁셀을 첨가한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 조성물 및 분산액을 제조하고 입자 크기를 측정한 결과 조성물은 물에 잘 분산되었으며 입자 크기는 630 nm였다. 그러나 분산후 약 1시간이 경과한 후 편광현미경 상에서 파클리탁셀의 침전이 관찰되었으며, 분산액이 불안정해짐을 관찰하였다.

<87> <비교예 3>

<88> 모노올레인이 첨가되지 않은 유화제를 첨가한 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조 1

<89> 트리카프릴린 1 g, tween 80 0.2 g의 유성용액에 7.2 mg의 파클리탁셀을 첨가한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 조성물 및 분산액을 제조하고 입자 크기를 측정한 결과 조성물은 물에 잘 분산되었으며 입자 크기는 560 nm였다. 분산액은 상변화 없이 안정하였으며 파클리탁셀의 침전역시 관찰되지 않았다.

<90> <실시예 3>

<91> 오일의 변화에 따른 유화제를 첨가한 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조 1

<92> 모노올레인 1 g, 트리부티린 0.5 g과 tween 80 0.3 g의 유성용액에 18 mg의 파클리탁셀을 첨가한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 조성물 및 분산액을 제조하고 입자 크기를 측정한 결과 조성물은 물에 잘 분산되었으며 입자 크기는 950 nm였다. 분산 후 24시간이 경과하여도 파클리탁셀의 침전이 편광현미경 상에서 관찰되지 않았으

며 분산계는 상분리 없이 안정하였다. 상기 조성물은 상온에서는 반고상, 냉장 보관시 고상으로 존재하나 40 °C 이상에서는 액상으로 존재한다.

<93> <실시예 4>

<94> 오일의 변화에 따른 유화제를 첨가한 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조 2

<95> 모노올레인 1 g, 리파이오돌 (Lipiodol Ultra-fluid, Laboratoire Guerbet, France, 요오드 함량: 38 중량%) 0.5 g과 tween 80 0.3 g의 유성용액에 18 mg의 파클리탁셀을 첨가한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 조성물 및 분산액을 제조하고 입자 크기를 측정한 결과 조성물은 물에 잘 분산되었으며 입자 크기는 680 nm였다. 분산 후 24시간이 경과하여도 파클리탁셀의 침전이 편광현미경 상에서 관찰되지 않았으며 분산계는 상분리 없이 안정하였다. 상기 조성물은 상온에서는 반고상, 냉장 보관시 고상으로 존재하나 40 °C 이상에서는 액상으로 존재한다.

<96> <실시예 5>

<97> 오일의 변화에 따른 유화제를 첨가한 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조 3

<98> 모노올레인 1 g, 스쿠알란 (squalane, Sigma Chemical Company) 0.5 g과 tween 80 0.3 g의 유성용액에 18 mg의 파클리탁셀을 첨가한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 조성물 및 분산액을 제조하고 입자 크기를 측정한 결과 조성물은 물에 잘 분산되었으며 입자 크기는 598 nm였다. 분산 후 24시간이 경과하여도 파클리탁셀의 침전이 편광현미경상에서 관찰되지 않았으며 분산계는 상분리 없이 안정하였다. 상기 조성물은 상온에서는 반고상, 냉장 보관시 고상으로 존재하나 40 °C 이상에서는 액상으로 존재한다.

<99> <실시예 6>

<100> 오일의 변화에 따른 유화제를 첨가한 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조 4

<101> 모노올레인 1 g, 흥화씨 기름(safflower seed oil, Sigma Chemical Company) 0.5 g
과 tween 80 0.3 g의 유성용액에 18 mg의 파클리탁셀을 첨가한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 조성물 및 분산액을 제조하고 입자 크기를 측정한 결과 조성물은 물에 잘 분산되었으며 입자 크기는 1040 nm였다. 분산 후 24시간이 경과하여도 파클리탁셀의 침전이 편광현미경상에서 관찰되지 않았으며 분산계는 상분리 없이 안정하였다. 상기 조성물은 상온에서는 반고상, 냉장 보관시 고상으로 존재하나 40 °C 이상에서는 액상으로 존재한다.

<102> 상기 실시예 5 내지 실시예 8의 결과를 종합하여 각조성물의 함량 및 물에 분산하였을 때의 입자크기 및 분산도를 하기 표 3에 나타내었다.

<103> 【표 2】

기름의 종류*	입자크기 (nm)	실시예
트리부티린	950 (0.661)	3
리피오돌	680 (1.000)	4
스쿠알란	597 (0.550)	5
흥화씨기름	1040 (0.497)	6
*모노올레인:기름:트원 80:파클리탁셀= 55:28:16:1 (무게비)		

<104> <실시예 7>

<105> 파클리탁셀의 함량 변화에 따른 유화제를 첨가한 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조 1

<106> 모노올레인 1 g, 트리카프릴린 0.5 g과 tween 80 0.3 g의 유성용액에 38 mg의 파클리탁셀을 첨가한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 조성물 및 분산액을 제조

하고 입자 크기를 측정하였다 그 결과 조성물은 물에 잘 분산되었으며 입자 크기는 1450 nm 였다. 분산 후 24시간이 경과하여도 파클리탁셀의 침전이 편광현미경상에서 관찰되지 않았으며 분산계는 상분리 없이 안정하였다. 상기 조성물은 상온에서는 반고상, 냉장 보관시 고상으로 존재하나 40 °C 이상에서는 액상으로 존재한다.

<107> <실시예 8>

<108> 파클리탁셀의 함량 변화에 따른 유화제를 첨가한 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조 2

<109> 모노올레인 1 g, 트리카프릴린 0.5 g과 tween 80 0.3 g의 유성용액에 54 mg의 파클리탁셀을 첨가한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 조성물 및 분산액을 제조하고 입자 크기를 측정하였다 그 결과 조성물은 물에 잘 분산되었으며 입자 크기는 1630 nm 였다. 분산 후 24시간이 경과하여도 파클리탁셀의 침전이 편광현미경상에서 관찰되지 않았으며 분산계는 상분리 없이 안정하였다. 또한 조성물은 상기 실시예 1 내지 실시예 7에서 제조된 조성물과는 달리 상온에서는 액상, 냉장보관시 고상으로 존재하였다.

<110> 상기 실시예 9와 실시예 10의 결과를 종합하여 각조성물의 함량 및 물에 분산하였을 때의 입자크기 및 분산도를 하기 표 3에 나타내었다.

<111> 【표 3】

함량 (무게 %)				입자크기 (nm)	실시예
모노올레인	트리카프릴린	트원 80	파클리탁셀		
55	27	16	2	1450 (1.000)	7
54	27	16	3	1630 (1.000)	8

<112> <실시예 9> 유화제의 변화에 따른 유화제를 첨가한 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조 1

<113> 트윈 80 대신에 플루로닉 F-68 (BASF사)를 사용하고 18 mg의 파클리탁셀을 넣은것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 조성물 및 분산액을 제조하고 입자 크기를 측정하였다 그 결과 조성물은 물에 잘 분산되었으며 입자 크기는 420 nm (분산도 0.284) 였다. 분산 후 24시간이 경과하여도 파클리탁셀의 침전이 편광현미경상에서 관찰되지 않았으며 분산계는 상분리 없이 안정하였다. 상기 조성물은 상온에서는 반고상, 냉장 보관 시 고상으로 존재하나 40 °C 이상에서는 액상으로 존재한다.

<114> <실시예 10>

<115> 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 방광내 투여 실험 (정상토끼)

<116> 상기 실시예 1에서 제조한 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물로 동물실험을 수행하였다.

<117> ① 실험동물

<118> 무게가 약 2.5 ~ 3 kg 되는 8주 된 뉴질랜드 화이트 래빗(New Zealand White Rabbit)을 암수 구별하지 않고 군당 2 마리씩 사용하였다.

<119> ② 파클리탁셀 조성물의 방광내 투여실험

<120> 토끼의 복강내로 희석된 소듐 펜토바비탈(sodium phenobarbital, 6 mg/ml)을 전신 마취제로 투여한다. 마취한 실험동물의 요도를 통해 10 Fr 요도카테터를 방광까지 삽입한 후 ballooning 하여 카테터를 고정하고 방광내 소변을 모두 비운다. 대조군으로는 Taxol® 20 ml를 투여하고 실험군으로는 방광암치료용 상기 실시예 1의 파클리탁셀 조성을 1 ml (파클리탁셀 6 mg)를 처치하였다. 또한, 실시예 1의 파클리탁셀 조성을 1 ml를 19 ml의 물에 분산시켜 분산대조군으로 투여하였다. 방광내투여 후 클램핑(clamping)하

여 투여약물의 유출을 막는다. 2시간이 지난 후 동물을 희생하고, 방광, 소변, 혈중에서의 파클리탁셀농도를 정량하였다.

<121> ③ 파클리탁셀의 정량 (HPLC 방법)

<122> 체취된 $200\mu\text{l}$ 의 혈액을 internal standard로서 $20\mu\text{l}$ 의 부틸 파라벤 ($100\mu\text{g}/\text{ml}$)이 들어있는 코니칼 튜브(conical tube)에 넣고, 0.5ml 의 35mM 암모늄 아세테이트(ammonium acetate)를 가한 후 4 ml 의 tert-부틸메틸 에테르를 가하여 추출한다. 추출 후 원심분리하여 유기용매층을 취하여 감압하에 증발건조시킨다.

<123> 건조된 잔사에 60% 아세토니트릴 $100\mu\text{l}$ 를 가해 녹인후 HPLC에 $20\mu\text{l}$ 를 주입 분석한다. 소변의 경우 혈액과 동일한 추출과정을 거친다. 방광조직은 $1-2\text{ml}$ 의 35mM 암모늄 아세테이트 버퍼를 가해 울트라소니케이션으로 균질화시킨 후 혈액과 동일한 추출과정을 거친다.

<124> HPLC 시스템은 Hitachi HPLC를 사용하였으며, Hitachi L-7100 펌프, Hitachi L-4200H UV-VIS 탐지기, D-2500 인테그레이터를 사용하였다. 이동상은 0.1% 인산완충 용액 ($\text{pH} = 6.86$)과 아세토니트릴을 동량 혼합하여 사용하였으며 $1\text{ ml}/\text{min}$ 의 속도로 흘려주었고, 227 nm 에서 정량하였다.

<125> ④ 혈액, 소변, 방광조직 내의 파클리탁셀 농도

<126> 실험군인 실시예 1의 방광암치료용 파클리탁셀 조성물과 대조군인 분산대조군, Taxol

⑧ 투여군에서의 소변, 방광조직 내의 파클리탁셀 농도를 도 3에서 보여준다. 혈액 내에서는 실험군과 대조군 모두 전혀 파클리탁셀이 검출되지 않았다. 소변에서는 실험군과 대조군에서의 파클리탁셀의 농도가 $90 \sim 150 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 각 군간의 차이는 유의성이 없으며, 농도차이는 실험동물의 소변량의 차이 ($50 \sim 100 \text{ ml}$)에 기인하는 것으로 보인다. 그러나 방광조직내의 파클리탁셀의 농도는 실험군의 경우 약 $4 \mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 나타났으나, 분산대조군, Taxol® 투여군에서는 약 $0.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ 이하로 방광조직에는 거의 침투되지 않는 것으로 나타났다.

<127> ④ 방광조직 깊이에 대한 파클리탁셀 농도 변화

<128> 본 발명의 방광암치료용 파클리탁셀 조성물이 방광조직을 침투하는 정도를 측정하기 위하여 실험군인 실시예 1의 방광암치료용 파클리탁셀 조성물과 대조군인 분산대조군, Taxol® 투여군을 방광내 투여한 후 방광조직의 깊이의 변하에 따른 파클리탁셀 농도를 도 4에서 보여준다. 외부의 이행상피, 결합조직층으로부터 내부의 민무늬근층까지의 방광조직을 $40 \mu\text{m}$ 의 두께로 절단하여 이행상피층중 가장 바깥쪽에 위치하여 파클리탁셀이 직접 접촉한 절단면과 민무늬근층의 가장 안쪽의 절단면은 버리고 나머지 절단면들을 10 개 쪽 묶어서 조직에서의 파클리탁셀의 농도를 HPLC로 정량하였으며 그 결과를 도 4에서 보여준다.

<129> 분산 대조군, Taxol® 투여군에서는 방광조직에서 파클리탁셀의 농도가 검출한계이하 ($0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)인 것으로 나타났다. 반면에 실험군인 실시예 1의 방광암치료용 파클리탁셀 조성물을 방광내 투여한 군에서는 방광조직의 이행상피과 근육층인 민무늬근층의 일부까지 침투한 것으로 나타났다.

- <130> <실시 예 11>
- <131> 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 방광내 투여 실험 (동소성 방광암 모델 생쥐)
- <132> 상기 실시예 2에서 제조한 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물로 동물실험을 수행하였다.
- <133> ① 실험동물
- <134> 무게가 약 17 ~ 20 mg 되는 6 ~ 8주 된 C3H2 암 생쥐를 대전생명공학연구소로부터 구입하여 물과 고형압축사료로 하나의 사육상자 당 5마리를 출입이 통제된 지역에서 기온 20°C, 습도 50~50%의 환경 하에서 사육한다.
- <135> ② 이식을 위한 종양세포 배양
- <136> 방광암 세포주인 MBT-2 (murine bladder tumor-2) 세포를 시험관내서 10 % 소의胎아 혈청(fetal calf serum, FCS)과 1 % 폐니실린/스트렙토마이신이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)에 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한다. 종양세포를 트립신 처리하여 L-글루타민, FCS와 항생제가 첨가되지 않은 상태로 DMEM에 혼합한다. 종양세포의 생존여부는 trypan blue exclusion을 이용하여 결정하며, 종양세포가 90%이상 생존을 나타내는 것만을 종양이식에 사용하고, 이식을 위한 종양세포의 농도는 1 ml당 세포수가 1 x 10⁶ 가 되게 한다.
- <137> ③ 생쥐 방광내 종양이식술
- <138> 복강내로 희석된 소듐 펜토바비탈 (6 mg/ml)을 전신 마취제로 투여한다. 쥐의 등쪽에 면도를 시행한 후에, 테프론 정맥내 카테터(teflon intraveous catheter)를 경요도로

방광내로 위치시킨다. ECG-electrode contact gel을 발라서 등이 바닥을 향하게 준비한 후 가이드 와이어를 teflon intraveous catheter을 통해 방광내로 진입시킨 후에 방광 벽에 이를 때까지 조심스럽게 밀어 넣는다. Coagulation setting으로 5초 동안 monopolar coagulation을 시행한 후 가이드 와이어를 제거하고 0.1ml 의 종양 혼탁액 (1×10^6 cells/ml)을 방광내로 주입한다. 방광암세포가 방광내에 오래동안 머물러 있게 하기 위해서 주입한 직후에 클램프(clamp)를 시행하고 쥐가 깨어날 때까지 카테터를 유지 시켜두어 종양 세포 혼탁액은 방광내에 약 1시간 정도 머무를 수 있도록 한다.

<139> ④ 파클리탁셀 조성물의 방광내 투여실험

<140> 방광암세포를 방광내로 주입한후 24시간 경과후, 인산완충용액 (phosphate buffered saline, PBS) 0.2 ml를 처치하는 대조군 19 마리와 방광암치료용 상기 실시예 1의 파클리탁셀 조성을 0.2 ml (파클리탁셀 1.2 mg/mouse)를 처치한 실험군 3 마리로 나누어 방광내 각각 주입하고 60분 동안 클램핑하여 투여약물의 유출을 막는다. 1시간이 지난 후 클램프를 없애고 자유롭게 먹이와 물을 먹고, 배뇨를 할 수 있는 상태에서 14 일간 사육한다. 각 군에서 실험 시작 14 일째에 종양 발생율, 약물의 독성 및 조직 소견 을 관찰하기 위해 해부를 시행하였다.

<141> ⑤ 통계처리

<142> Mann-Whitney-U-Test를 이용한 통계분석을 하며 p값이 0.05 이하 일때를 유의한 것으로 한다.

<143> ⑥ 종양발생율

<144> 대조군 19 마리에서 종양발생빈도는 13 마리 (68.4%)였으며, 실험군 3 마리에선 1 마리 (33.3%)의 방광암이 발생하여 통계학적으로 의의있게 감소하였다($p<0.05$, Fisher's exact test). 절취된 방광은 표본 제작 과정에 따라 포름알데히드에서 고정한 후 파라핀 블록(paraffin block)을 만들어 6 μm 두께의 표본을 만들고 헤마토실린-에오신 (hematoxylin-eosin) 염색을 한 후 검경한 결과를 도 3에서 보여준다. 대조군에서는 표재성 방광암이 조직전체에 고르게 발생한 반면, 실험군에서는 2 마리의 쥐에서는 정상조직을 보였으며, 나머지 한 마리에서 약간의 종양이 관찰되었다.

<145> ⑦ 방광무게변화

<146> 대조군에서의 방광무게는 $94.8 + 24.5 \text{ mg}$, 실험군에서의 방광무게는 $28.8 + 6.7 \text{ mg}$ 로 (도 4) 방광암 치료용 파클리탁셀 조성물을 주입한 실험군에서 방광의 무게가 의의 있게 감소하였다($p<0.05$, Mann-Whitney-U-Test).

<147> ⑧ 독성

<148> 방광암 치료용 파클리탁셀 조성물을 주입한 실험군의 콩팥, 간, 골수 및 말초혈액에서 PBS를 처리한 대조군과 동일한 병리소견을 보이며 독성변화는 관찰되지 않았다.

<149> <실시예 12>

<150> 방광암치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 In vitro 세포독성 실험

<151> 상기 실시예 1에서 제조한 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물로 in vitro 실험을 수행하였다.

<152> ① 세포 배양

- <153> 세포주로는 rat bladder carcinoma cell line인 NBT-2 세포를 주로 사용하였다. NBT-2 세포는 10% FBS, 1% 비필수 아미노산, 100U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 함유되어 있는 DMEM을 가해 37°C에서 배양하였다.
- <154> ② 세포독성 평가
- <155> 96 웰 플레이트에 5×10^4 cell/ml의 세포 용액을 100 μ l씩 가한 후, 37°C에서 배양하였다. 24시간 후, 파스퇴르 파이펫으로 배지를 완전히 제거하고, 실시예 2의 방광암 치료용 파클리탁셀 조성을 희석하여 배지와 섞은후 가하여 24 시간 동안 배양하였다. 조성을 함유한 배지를 제거하고, 새로운 배지 100 μ l를 가한 후, Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)에 녹여 5mg/ml의 농도로 제조한 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액 50 μ l를 가했다. 암소에서 37°C의 온도에서 네 시간 배양 후, 파스퇴르 파이펫으로 배지를 제거하고, 200 μ l의 디메틸су勖사이드와 25 μ l의 글리신 버퍼(pH 10.5)를 차례대로 가한 후 570 nm에서 흡광도를 읽었다. 세포생존율은 다음 식으로 구하였다.

<156> 세포생존율 (Cell viability, %) =	실험군에서의 흡광도	$\times 100$
	대조군에서의 흡광도	

- <157> 대조군은 방광암 치료용 파클리탁셀 조성을 희석하여 배지와 섞은 용액을 가하기 전의 세포이다. 여러 가지 파클리탁셀 농도에서의 세포생존율을 도 5에서 보여준다. 파클리탁셀을 함유하지 않은 것을 제외하고 실시예 2와 동일하게 모노올레인 1 g, 트리카프릴린 1 g과 tween 80 0.4 g을 섞어서 만든 유성용액을 비교예로 제조하여, 방광암 치료용 파클리탁셀 조성을 동일한 비율로 희석하여 세포생존율을 측정하였다. 비교조성물의 경우 농도에 관계없이 약 130 %의 세포생존율을 보이므로 세포독성이 전혀 없음을

알 수 있다. 반면에 실시예 1 의 방광암 치료용 파클리탁셀 조성물의 경우 파클리탁셀 농도 0.1 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 투여량에 비례하여 세포독성이 증가하는 것을 볼 수 있다.

【발명의 효과】

<158> 본 발명은 파클리탁셀을 가용화시킬 수 있고, 시간이 경과하여도 침전을 형성하지 아니하며, 점막흡착성이 우수한 파클리탁셀 가용화용 조성물에 봉입된 파클리탁셀 제제를 제공하며, 본 제제는 방광내에 직접 투여되어 방광암 세포를 효과적으로 괴사시킬 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

조성물의 총 중량을 기준으로, 한 가지 이상의 모노글리세라이드 (monoglyceride) 계 화합물 4~90 중량%, 한 가지 이상의 기름 (oil) 0.01~90 중량%, 한 가지 이상의 유화제 0.01~90 중량% 및 파클리탁셀 (paclitaxel) 0.01 ~ 20 중량%를 포함하는 방광내 투여를 위한 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 모노글리세라이드계 화합물이 탄소수 10 내지 22 개의 포화 또는 불포화된 모노글리세라이드계 화합물인 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서, 상기 모노글리세라이드계 화합물이 모노올레인(Monoolein), 모노팔미톨레인(Monopalmitolein), 모노미리스톨레인(Monomyristolein), 모노일레이딘(Monoelaidin), 모노이루이신(Monoerucin) 및 식물성 또는 동물성 기름의 트리글리세라이드로부터 반합성된 모노글리세라이드의 혼합물로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 기름이 트리글리세라이드, 요오드화 기름, 식물성 기름 및 동물성 기름으로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서, 상기 트리글리세라이드가 탄소수 2 내지 20개의 포화 또는 불포화 트리글리세라이드인 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 상기 트리글리세라이드가 트리아세틴, 트리부티린, 트리카프로인, 트리카프릴린, 트리카프린 및 트리올레인으로 구성되는 군 중에서 선택되는 파클리탁셀의 방광암 치료용 가용화용 조성물.

【청구항 7】

제 4 항에 있어서, 상기 요오드화 오일이 리파이오돌, 요오드화 양귀비씨 기름, 에티오돌 및 요오드화 대두유로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 8】

제 4 항에 있어서, 상기 식물성 기름이 콩기름, 면실유, 올리브유, 양귀비씨 기름, 홍화씨기름 및 참기름으로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 9】

제 4 항에 있어서, 상기 동물성 기름이 스쿠알란 또는 스쿠알렌인 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 10】

제 1 항에 있어서, 상기 유화제가 인지질, 비이온성 계면 활성제, 음이온성 계면 활성제, 양이온성 계면 활성제 및 담즙산으로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 11】

제 10 항에 있어서, 상기 인지질이 포스파티딜콜린 (PC) 유도체, 포스파티딜에탄을 아민 (PE) 유도체, 포스파티딜세린 (PS) 유도체 및 친수성 고분자가 결합된 지질 (polymeric lipid)로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 12】

제 10 항에 있어서, 상기 비이온성 계면 활성제가 폴록사머 (Poloxamer; Pluronic; 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중합체), 솔비탄 에스테르 (Sorbitan esters; Span), 폴리옥시에틸렌 솔비탄 (polyoxyethylene sorbitans; Tween) 및 폴리옥시에틸렌 에테르 (polyoxyethylene ethers; Brij)로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 13】

제 10 항에 있어서, 상기 음이온성 계면 활성제가 포스파티딜세린 (PS) 유도체, 포스파티딘산 (PA) 유도체 및 소듐 도데실 설레이트 (SDS)로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 14】

제 10 항에 있어서, 상기 양이온성 계면 활성제가 1,2-다이올레일-3-트리메틸암모니움 프로판 (DOTAP), 다이메틸 다이옥타데실암모니움 클로라이드 (DDAB), N-[1-(1,2-다이올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모니움 클로라이드 (DOTMA), 1,2-다이올레일-3-에틸포스포콜린 (DOEPC) 및 3β -[N-[(N',N'-다이메틸아미노)에탄]카바모일]콜레스테롤 (DC-Chol)으로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 15】

제 10 항에 있어서, 상기 담즙산은 콜린산, 그의 염 또는 그의 유도체, 데옥시콜린산, 그의 염 또는 그의 유도체, 체노콜린산, 그의 염 또는 그의 유도체, 및 리토콜린산, 그의 염 또는 그의 유도체로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 16】

제 1 항에 있어서, 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 ~ 5 중량%의 첨가제를 추가적으로 포함하는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 17】

제 16 항에 있어서, 상기 첨가제가 크레모포어, 토코페롤, 토코페롤 아세테이트, 지방산, 지방산의 에스테르류, 지방산의 알코올류, 난용성 약물, 알코올 및 폴리올로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 18】

제 17 항에 있어서, 상기 난용성 약물이 항암제, P-당단백질 억제제 및 간대사제제로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 19】

제 18 항에 있어서, 상기 항암제가 독소루비신, 시스플라틴, 카보플라틴, 카무스틴 (BCNU), 다카바진, 에도포사이드, 플루오로우라실 (5-FU) 및 파클리탁셀 유도체로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 20】

제 19 항에 있어서, 상기 파클리탁셀 유도체가 도시탁셀, 브로모탁셀 및 탁소티어로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 21】

제 18 항에 있어서, P-당단백질 억제제가 신코닌, 칼슘 채널 저해제, 칼모듈린 길항제, 빈카 알칼로이드, 항부정맥제, 스테로이드, 항고혈압제, 구충제, 및 면역억제제로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 22】

제 21 항에 있어서, 상기 칼슘 채널 저해제가 베라파밀, 니페디핀, 니카디핀, 및 니트렌디핀으로 구성되는 군 중에서 선택되는 디히드로피리딘인 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 23】

제 21 항에 있어서, 상기 칼모듈린 길항제가 트리플루오로페라진인 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 24】

제 21 항에 있어서, 상기 항고혈압제가 레세핀인 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 25】

제 21 항에 있어서, 상기 빈카 알칼로이드(Vinca alcaloid)가 빈크리스틴 또는 빈블라스틴인 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 26】

제 21 항에 있어서, 상기 스테로이드가 프로게스테론인 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 27】

제 21 항에 있어서, 상기 항부정맥제가 아미오다론 또는 쿠니딘인 방광암 치료용 파크리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 28】

제 21 항에 있어서, 상기 구충제가 쿠나크린 또는 쿠닌인 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 29】

제 21 항에 있어서, 상기 면역억제제가 사이클로스포린류, 스타우로스포린 및 태크로리머스로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 30】

제 18 항에 있어서, 상기 간대사저해제가 사이클로스포린 A, 독소루비신, 에토포사이드(VP-16), 및 시스플라틴으로 구성되는 군에서 선택되는 항암제, 베라파밀, 또는 타모시펜인 방광암 치료용 파크리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 31】

제 17 항에 있어서, 상기 알코올이 메탄올, 에탄올, 프로판올, 및 이소프로판올로 구성되는 군 중에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 32】

제 17 항에 있어서, 상기 폴리올이 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 및 폴리에틸렌글리콜로 이루어진 군에서 선택되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 33】

1) 조성물의 총 중량을 기준으로, 4 내지 90 중량%의 한 가지 이상의 모노글리세라이드계 화합물 및 0.01 내지 90 중량%의 한 가지이상의 기름을 0.01 내지 90 중량%의 한 가지 이상의 유화제와 함께 50 °C 이하로 가온하여 완전히 용해시켜 점성의 액체를 만드는 제 1 단계; 및

2) 상기 제 1 단계의 액체를 0.01 내지 20 중량%의 파클리탁셀과 혼합하여 균일한 상을 제조하는 2 단계를 포함하여 구성되는 제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 따른 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조방법.

【청구항 34】

제 33 항에 있어서, 제 1 단계에서의 용해를 용이하게 하기 위하여 상기 제 1 단계를 50 °C 이하로 가열하여 수행하는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조방법.

【청구항 35】

제 33 항에 있어서, 제 2 단계에서의 용해를 용이하게 위하여 상기 제 2 단계를 50 °C 이하로 가열하거나 베쓰형 소니케이터에서 소니케이션하여 수행하는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조방법.

【청구항 36】

1) 조성물의 총 중량을 기준으로, 0.01 내지 90 중량%의 한 가지 이상의 기름을 0.01 내지 20 중량%의 파클리탁셀과 완전히 녹여 파클리탁셀 용액을 만드는 제 1 단계; 및

2) 상기 제 1 단계의 파클리탁셀 용액을 0.01 내지 90 중량%의 한 가지 이상의 유화제 및 4 내지 90 중량%의 한 가지 이상의 모노글리세라이드계 화합물과 혼합하여 균일한 상을 제조하는 제 2 단계를 포함하여 구성되는 제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 따른 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조방법.

【청구항 37】

제 36 항에 있어서, 제 2 단계에서의 용해를 용이하게 위하여 상기 제 2 단계를 50 ℃ 이하로 가열하고 베쓰형 소니케이터에서 소니케이션하여 수행하는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물의 제조방법.

【청구항 38】

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 있어서, 표재성 또는 침윤성 방광암 치료를 위하여 경요도적 방광암 절제술의 시행 후, 방광 내로 직접 투여되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 39】

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 있어서, 소변의 양을 10 ml 또는 그 이하로 줄인 후, 요도 카테터를 이용하여 방광 내로 10 ~ 100 ml의 양으로 주입되어 최소 2 시간 이상 방광 내에 머물게 되는 방광암치료를 위한 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 40】

제 39 항에 있어서, 소변의 생성속도를 1 ml/min 또는 그 이하로 조절하는 방법이 추가되어 방광내로 주입되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 41】

제 39 항에 있어서, 1 회 이상 방광내로 주입되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

1020020042792

출력 일자: 2003/7/15

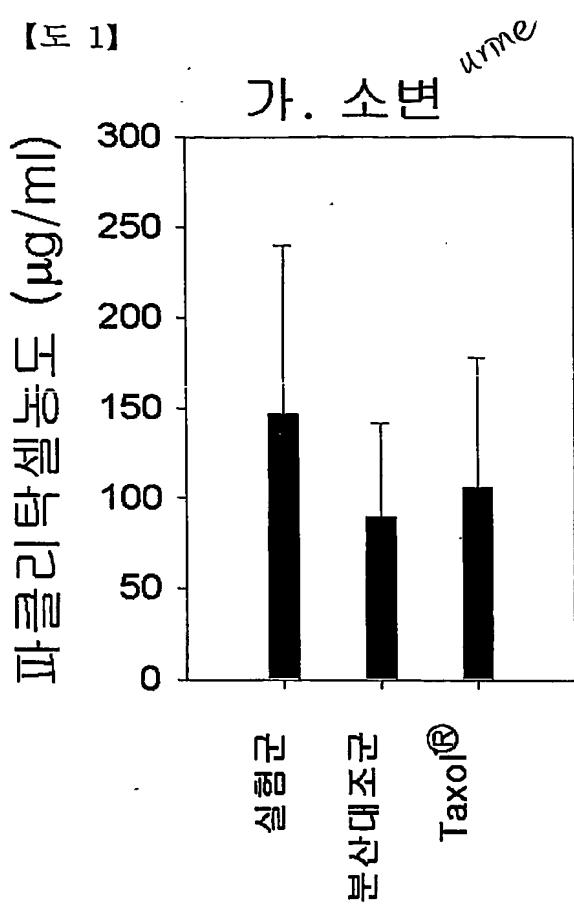
【청구항 42】

제 39 항에 있어서, 6 주 이상 방광 내에 주입되는 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【청구항 43】

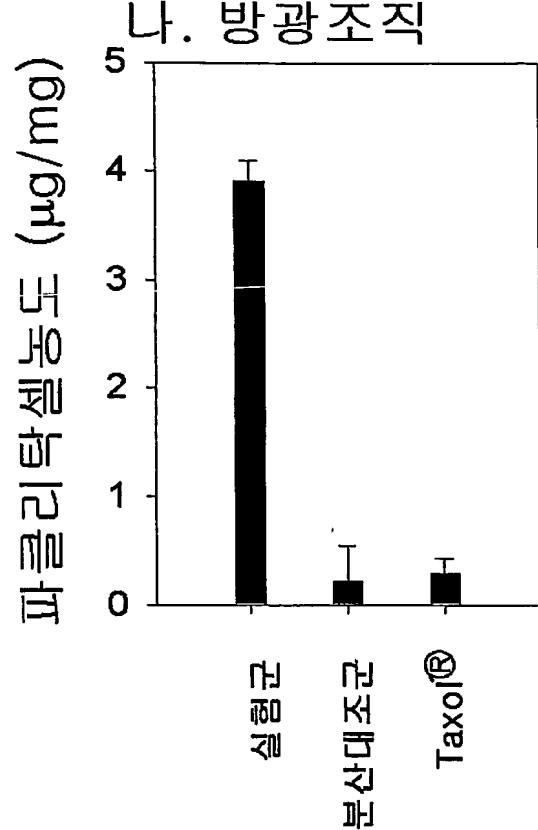
제 1 항 내지 32 항에 있어서, 상기 치료되는 방광암이 Ta, T1 또는 Tis 종양인 방광암 치료용 파클리탁셀의 가용화용 조성물.

【도 1】

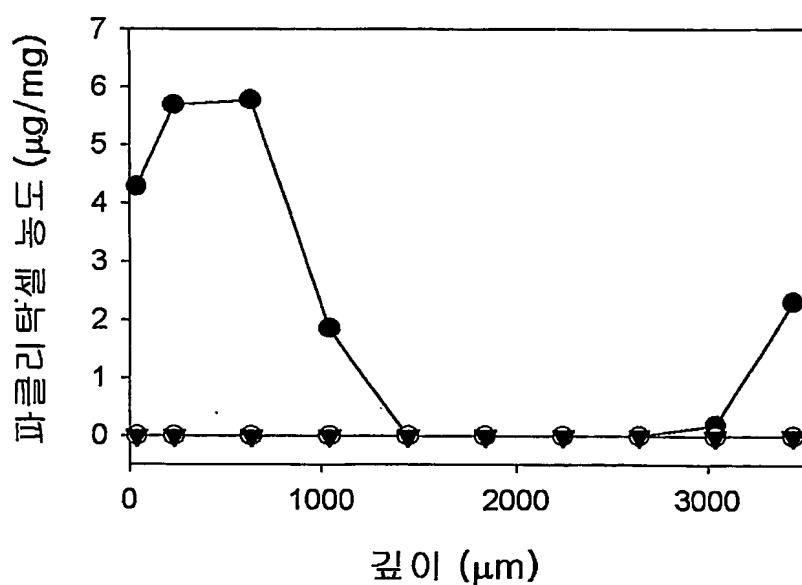


【도면】

나. 방광조직



【도 2】

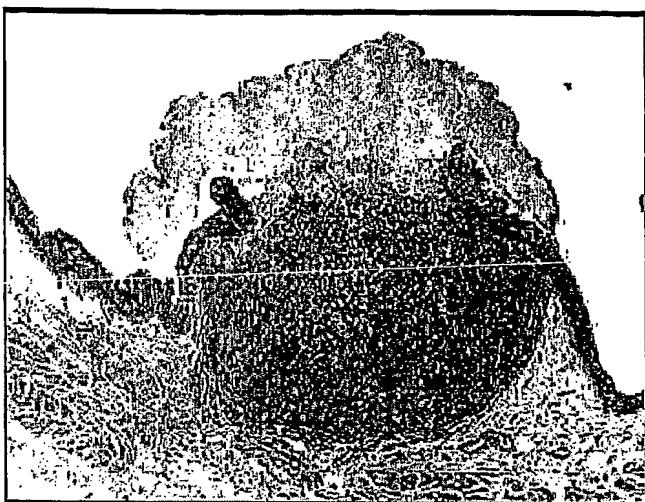


1020020042792

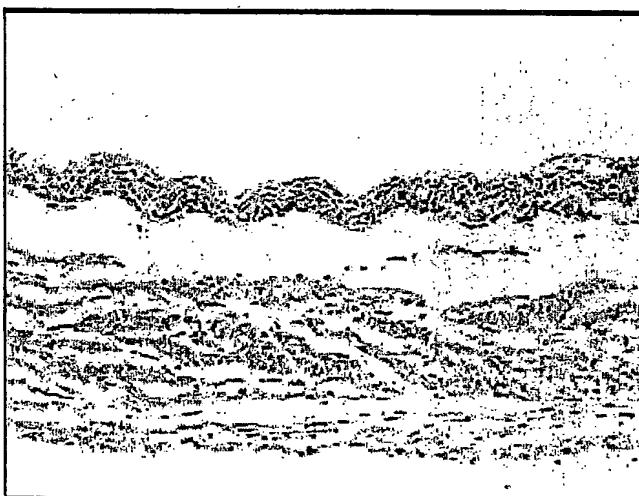
출력 일자: 2003/7/15

【도 3】

가. 대조군



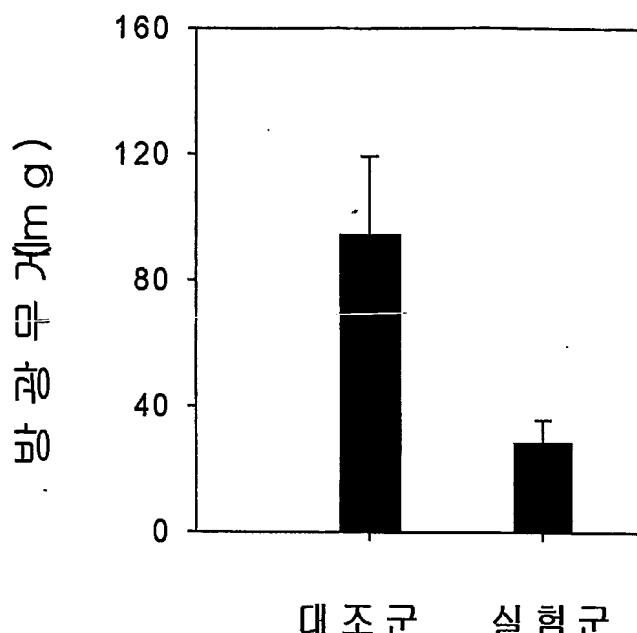
나. 실험군



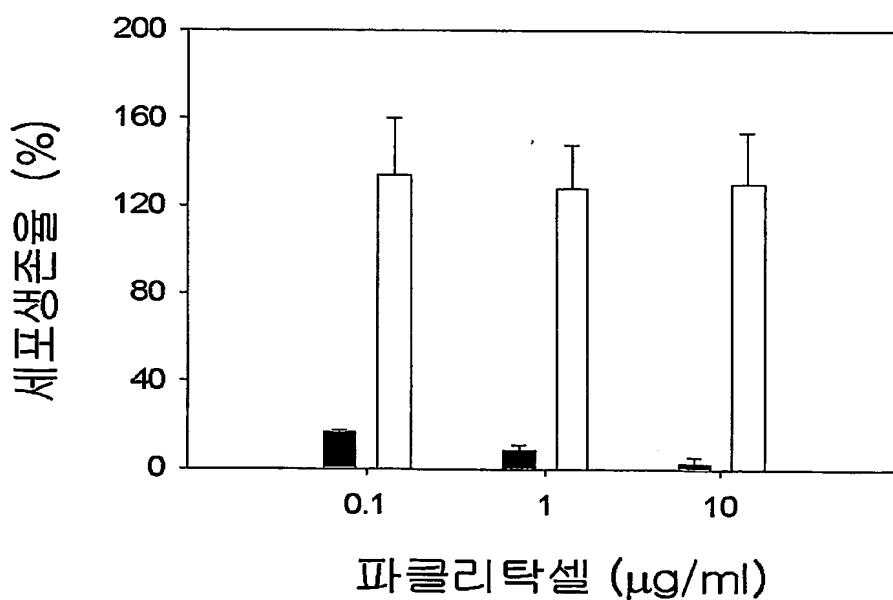
1020020042792

출력 일자: 2003/7/15

【도 4】



【도 5】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.